

## ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ГРИБА *TRICHODERMA VIRENS* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ТВЕРДЫХ И ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

**Татьяна ЩЕРБАКОВА**

*Институт защиты растений и экологического земледелия АН Молдовы*

Au fost studiate 12 medii nutritive agarizate în 4 regimuri de temperatură, asupra vitezei de creștere a ciupercii *Trichoderma virens*. S-au evidențiat 2 medii nutritive pentru cultivarea ciupercii în condiții de laborator, fiind stabilite temperaturile optime. A fost studiată depunerea biomasei ciupercii pe 4 medii nutritive lichide, în cultura staționară, la temperatură optimă.

The influence of 12 nutrient mediums with agar-agar and 4 temperature regimes on growth rate of fungus *T.virens* is studied. Two nutrient mediums for cultivation the fungus under laboratory conditions are selected. The optimal temperature range is established. The accumulation of a biomass of the fungus on 4 liquid nutrient mediums in stationary culture at optimum temperature is studied.

### **Введение**

Использование грибов-антагонистов в защите сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей связано с потребностями искусственного культивирования для изучения их биологических особенностей и получения грибных биопрепаратов. При этом необходимо подобрать питательные среды – дешевые, доступные и несложные в приготовлении. Одной из стандартных питательных сред для культивирования многих грибов является неохмеленное пивное сусло. Однако рост некоторых грибов на данной среде не является идеальным, поэтому возникает необходимость в использовании и другого, более продуктивного сырья.

Основным показателем развития гриба является скорость роста. На агаризованных питательных средах скорость роста часто оценивается по увеличению радиуса или диаметра колонии. Но при одинаковом диаметре культуры колонии могут значительно отличаться по плотности, высоте, интенсивности спорообразования, а значит, и по количеству образуемой биомассы, характеризующей рост. На рост грибов существенное влияние оказывают факторы внешней среды, особенно температура. Каждый вид гриба способен развиваться лишь в определенных температурных пределах, поэтому необходимо знание температурного режима при их использовании [1-3].

Целью исследований являлось изучение влияния температуры и состава питательной среды на рост гриба-антагониста *Trichoderma virens* (= *Gliocladium virens*) Miller, Giddens and Foster на твердых и жидких питательных средах.

### **Материалы и методы**

Для определения скорости роста и массы выросшего мицелия были использованы 12 общепринятых агаризованных питательных сред.

Схема опыта, варианты сред:

1. Неохмеленное пивное сусло в соотношении сусло-вода (1:2). 2. Неохмеленное пивное сусло-вода (1:3). 3. Неохмеленное пивное сусло-вода (1:5). 4. Среда Чапека. 5. Картофельная среда. 6. Картофельная с сахарозой. 7. Соевая с сахарозой. 8. Овсяная. 9. Морковная. 10. Морковная с сахарозой. 11. Свекольная. 12. Свекольная с сахарозой.

Гриб *T.virens* культивировали в чашках Петри диаметром 90 мм, посев производили при помощи лабораторного сверла диаметром 8 мм у края чашки, поэтому для определения скорости роста измеряли радиус выросших колоний (в мм). Измерения культур проводили каждый день до полного зарастания чашки на одной из сред. Повторность опыта – четырехкратная. Скорость роста гриба учитывали при различной температуре культивирования: 20°, 25°, 30° и 35°C. Для получения более точных данных скорости роста гриба *T.virens* на различных агаризованных средах, определяли сухой вес выросшего мицелия [1].

Для определения зависимости накопления грибом *T.virens* биомассы от времени, исследования проводили на жидких питательных средах методом поверхностного культивирования [3]. Были использованы 4 питательных среды. Схема опыта, варианты сред: 1. Неохмеленное пивное сусло-вода 1:2, 2. Кукурузно-мелассная среда. 3. Картофельно-сахарозная. 4. Среда Чапека.

Гриб выращивали в 100 мл питательной среды в колбах объемом 500 мл, инкубировали в термостате при температуре 26-27°C. Так как процесс развития гриба во времени происходит неравномерно, определяли его биомассу на 3-й, 5-й, 10-й, 13-й, 15-й, 20-й и 25-й дни (7 учетов). Повторность опыта трехкратная.

**Результаты и их обсуждение**

При анализировании результатов учетов роста гриба на твердых средах отмечено, что при температуре 20°C гриб *T.virens* полностью осваивает чашку Петри через 10 суток на сусло-агаровых средах №№1-3, на среде №6 картофельно-сахарозной и №12 свекольной с сахарозой. Увеличение линейного роста гриба за сутки составляет, в среднем 9-10 мм (табл.1). Начало спороношения – на 5-6-е сутки. Наибольшее количество биомассы образуется на среде №6 – 86 мг с одной чашки, №8, на овсяном агаре, – 66 мг, и №12, свекольной с сахарозой, – 50 мг (табл.2). Наиболее продуктивной является среда №6 – картофельно-сахарозная. Рост гриба на этой среде интенсивный, мицелий высокий, плотный, ватообразный, начало спороношения – на 5-е сутки (спороношение характеризуется образованием спор зеленого цвета, мицелий белый). Количество образуемой биомассы наибольшее – 86 мг с одной чашки (20 мл среды).

Таблица 1

**Среднее суточное увеличение радиуса колоний (в мм) гриба *T.virens* на различных твердых питательных средах при различной температуре**

Среда	20°C	25°C	30°C	35°C
1	9,7±0,9	15,9±2,2	15,4±1,7	6,4±0,6
2	10,5± 0,8	16,6±1,1	16,3±1,4	6,0±2,1
3	9,9±0,3	16,9±1,6	16,4±1,3	6,7±1,5
4	11,3±2,3	16,8±2,2	15,7±1,7	7,4±0,3
5	6,8±0,6	10,2±0,9	8,6±1,0	4,7±1,1
6	9,5±0,5	16,8±2,2	14,0±1,1	5,4±0,9
7	9,7±0,8	16,0±3,2	14,0±1,7	6,9±2,4
8	8,5±0,4	14,7±1,7	12,0±0,9	5,8±1,2
9	10,8±0,8	16,4±3,5	14,6±1,5	3,0±0,7
10	10,9±0,7	17,4±4,4	17,2±2,4	5,6±1,7
11	10,2±0,8	15,3±1,8	12,6±0,7	6,3±1,9
12	10,9±1,0	15,9±1,3	14,5±1,0	7,5±2,2

При температуре 25°C полное зарастание чашек отмечено на девяти средах из 12-ти на 6-7-е сутки (рис.1). Средняя линейная скорость роста 14-17 мм в сутки (табл.1). Начало спороношения на – 2-3-и сутки. Наибольший выход биомассы на средах №8, овсяной, – 111,5 мг, №6, картофельно-сахарозной, 105,8 мг, №4 Чапека – 81 мг и среде №12, свекольной с сахарозой, –77мг (табл.2). Лучшими средами для работы с грибом *T.virens* являются среды №6, картофельно-сахарозная, и №12, свекольная с сахарозой. На среде №4 Чапека при большом линейном росте и большом выходе биомассы в первые дни культивирования наблюдается рост культуры ниже среднего: мицелий тонкий, ползучий, начало спороношения – на 4-5-е сутки, слабое, островками. Эту среду желательно использовать для сравнительных характеристик.

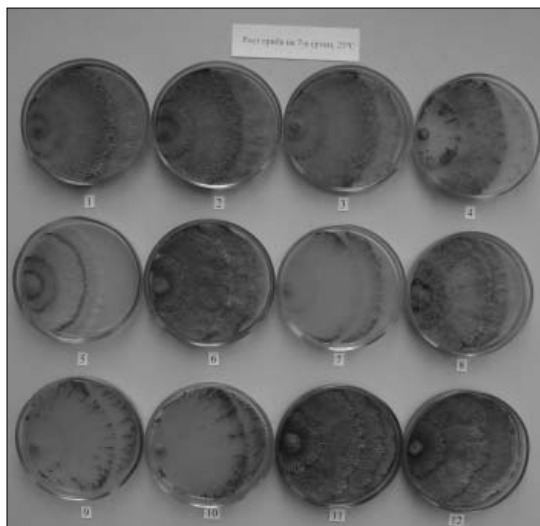
Температура 30°C также является благоприятной для роста, гриб полностью заселяет чашку на 6-7-е сутки на 8-ми средах из 12-ти, средняя скорость роста – 12-17 мм в сутки (табл.1). Начало спороношения – на 3-и сутки, на всех средах. Наибольший выход биомассы на средах №6 –157,6 мг и №12 –112,7 мг, на некоторых средах биомассы образуется больше, чем при температуре 25°C (табл.2).

Таблица 2

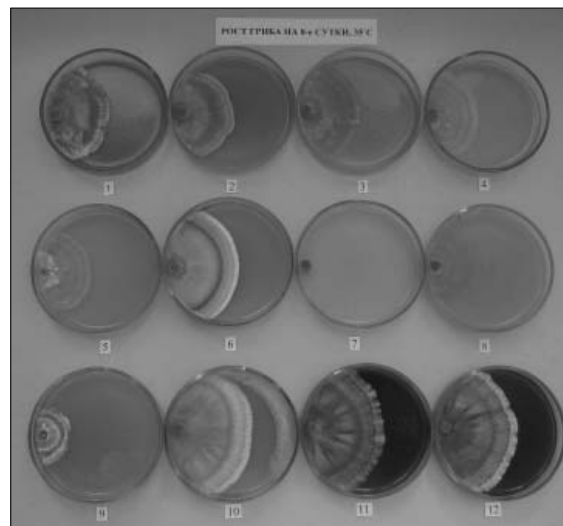
**Сухой вес мицелия гриба *T.virens* с 1-й чашки агаризованной питательной среды**

Среда, №	Сухой вес мицелия, мг			
	20°C	25°C,	30°C	35°C
1	27,2±2,1	51,3±3,8	50,4±4,9	42,4±1,7
2	28,8±1,2	49,2±1,3	34,8±1,5	28,7±1,9
3	22,8±1,5	38,4±2,7	28,2±0,9	23,8±2,4
4	34,9±4,8	81,0±5,5	62,6±5,3	33,5±3,4
5	22,7±1,7	35,2±2,2	27,6±0,8	8,3±0,9
6	86,2±6,2	105,8±3,7	157,6±7,9	99,4±0,6
7	12,0±1,3	28,8±1,3	30,4±3,6	15,2±1,8
8	66,6±8,5	111,5±8,7	87,0±5,0	32,3±1,0
9	22,4±1,4	42,9±6,8	40,8±2,9	13,8±0,5
10	23,2±1,6	44,9±5,0	58,9±3,4	49,3±2,8
11	37,4±1,7	60,7±2,2	68,6±7,5	36,2±2,2
12	42,9±1,0	77,0±2,4	112,7±5,1	56,3±1,8

При температуре 35°C рост колоний заметно замедляется, по истечении двух суток на некоторых средах отмечается только начало роста, на 7-8-е сутки колонии гриба достигают не более половины чашки, полного зарастания среды не отмечено и на 12-е сутки. Спороношение - только на 2-х средах, №6 и №12 (рис. 2). Средняя скорость роста – 3-7мм в сутки (табл.1). Однако при такой высокой температуре максимальное количество биомассы составляет 99,4 мг, которое продуцируется на картофельно-сахарозной среде №6. На свекольной среде с сахарозой (№12) вес сухого мицелия равен 56,3 мг (табл. 2).



**Рис.1.** Культивирование гриба *T.virens* при 25°C, 7-й день роста. Цифра указывает на порядковый номер питательной среды.



**Рис.2.** Культивирование гриба *T.virens* при 35°C, 8-й день роста.

В результате проведенных исследований подобраны питательные среды – недорогие, доступные и несложные в приготовлении. Это картофельно-сахарозная среда №6, свекольная с сахарозой №12 и свекольная №11. Среда из неохмеленного пивного суслу недостаточно показательна для культивирования данного гриба в чашках. Определен температурный оптимум для роста гриба *T.virens*, который составляет 25-30°C. При температуре 20°C наблюдается недостаточная скорость роста, а при 35°C рост гриба заметно замедляется. Температурные границы для роста гриба-антагониста *T.virens* представляют практический интерес, так как его используют в защите сельскохозяйственных культур от ущерба, наносимого фитопатогенными грибами, которые развиваются при более низких температурах (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* и др.).

В исследованиях по определению зависимости накопления грибом *T.virens* биомассы от времени на жидких питательных средах в условиях стационарной культуры было определено, что максимальное накопление биомассы происходит на 10-е сутки роста на среде №3 – картофельно-сахарозной, и составляет 1,175 г, затем начинается стадия автолиза. На 13-е сутки максимальное накопление биомассы отмечалось на кукурузно-меласной среде №2 и составляло 1,023 г. На среде №1 из пивного суслу максимум нарастания биомассы приходился на 20-е сутки и составлял 1,098 г, а на среде №4 Чапека –на 25-е сутки, составив 0,905 г (табл.3).

**Таблица 3**

**Количество биомассы, образуемое грибом *T.virens* в 100 мл жидкой питательной среды, вес сухого мицелия в граммах**

Среда, №	Возраст культуры, сутки						
	3	5	10	13	15	20	25
1	0,674±0,07	0,756±0,07	0,786±0,05	0,935±0,08	0,973 ±0,04	1,098±0,03	1,017±0,06
2	0,494±0,03	0,863±0,04	0,895±0,04	1,023 ±0,1	0,714±0,008	0,699±0,02	0,689±0,05
3	0,815 ±0,02	0,824±0,05	1,176±0,05	1,089±0,01	0,953 ±0,02	0,869±0,04	0,857±0,03
4	0,159±0,02	0,319±0,02	0,488±0,04	0,522±0,05	0,592 ±0,03	0,621±0,05	0,905±0,04

**Заключение**

• В процессе культивирования гриба *T.virens* на агаризованных питательных средах были подобраны недорогие, доступные и несложные в приготовлении среды, продуцирующие максимальное количество биомассы.

- Максимальная скорость роста гриба *T.virens* отличается при температуре 25-30°C и составляет 12-17 мм в сутки, при этом начало спороношения происходит на 2-3-и сутки, установлен максимальный выход биомассы.

- На жидких питательных средах максимальное накопление биомассы происходит на картофельно-сахарозной и кукурузно-меласной средах на 10-е и 13-е сутки соответственно, что позволяет сделать выбор при дальнейших исследованиях в использовании сред для глубинного культивирования.

**Литература:**

1. Беккер З.Э. Физиология грибов и их практическое использование. - Москва: Изд-во Московского университета, 1963. - 268 с.
2. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Общая микробиология. – Москва: Академия /Academia, 2007.- 288с.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С.Егорова. – Москва: МГУ, 1995. - 224 с.

*Prezentat la 10.07.2009*